

餐洗剂对小鼠骨髓细胞 SCE 形成 和 *Salmonella typhimurium* 基因回复突变的影响

胡嘉想 林世英[✓] 刘爱华 张汉云

(中国科学院昆明动物研究所 650107)

Q953.3

摘要 本研究采用 *Salmonella typhimurium* 基因回复突变测试和小鼠骨髓细胞姐妹染色单体交换 (SCE) 分析, 研究了四种餐洗剂及其主要成分 LABS、Dispersol D、Alkanolamide 的潜在诱变活性。结果表明四种牌号餐洗剂在高浓度时能诱发 SCE 形成。除 TL 牌餐洗剂加入 S9 代谢激活系统后未见诱变作用外, 其他三种餐洗剂和三种主要成分都表现出致 HisG46 和 HisD3052 基因回复突变的能力。在相当于人日常使用量时, 没观察到它们使 SCE 频率升高的现象, 也不表现出致 STY 基因回复突变的能力。实验还观察了餐洗剂对小鼠骨髓细胞增殖的毒性效应, 及其主要成分使细菌菌落异常生长的现象, 并讨论了不同诱变效应之间可能存在的关系。

关键词: 餐洗剂, 基因回复突变, 姐妹染色单体交换

SCE

表面活性物质——洗涤剂属于中等和低毒化学物质, 但在一定剂量下, 洗涤剂对酶系统产生抑制或激活作用, 抑制碳水化合物、蛋白质和核酸的合成。Mathur 等 (1989) 认为即使食物和饮水中少量的表面活性类物质也可能对健康有害。

兔眼刺激实验, 克隆形成和溶血实验, 微核测试, 姐妹染色单体交换, *Salmonella*/微粒体实验都说明洗涤剂和洗衣粉具有一定的毒性作用和诱变能力。但对餐洗剂的 SCE 测试和 STY 分析还未见报道。本研究旨在探讨餐洗剂这类表面活性物质的遗传效应。

材 料 和 方 法

实验用餐洗剂购自市场和由厂家提供。分别标号 BM、TL、XJ、KA。三种主要成分是脂肪醇聚乙醚硫酸盐 (Dispersol D), 烷基苯磺酸钠 (LABS), 烷基醇酰胺 (Alkanolamide)。

一、*Salmonella*/大鼠肝微粒体基因回复突变测试 菌株 TA100 和 TA98 来自 B. N. Ames 教授实验室。经鉴定, TA100 基因型为 HisG46、*rfa*、UVrB-/PKM101。TA98 基因型为 HisD3052、*rfa*、UVrB-/PKM101。

按 Moron (1985) 所描述的方法, 0.1 ml 对数生长期的菌株, 0.1 ml 待测物 (浓度见表 1), 0.5 ml 40% S9 混合液与组氨酸/生物素的顶层培养基混合, 铺皿, 置 37°C 培

养48小时, 计数回复突变菌落, 按“两倍原则”统计分析实验数据 (Kier, 1986)。

二、小鼠骨髓细胞 SCE 分析 以不同剂量餐洗剂连续7天灌喂昆明种小鼠 (20克), 等体积水溶剂为空白对照物 (见表2)。按Perry等人 (1984) 的方法, 活性碳吸附BrdU (2 mg/g鼠体重), 腹腔注射1小时后处死。

0.4% KCl低渗股骨骨髓细胞, 甲醇—冰醋酸固定液 (体积比3:1) 固定。空气干燥法制片。

采用Fluorescent Plus Giemsa改良方法分化染色 (Block, 1982)。双盲法读片。每鼠计数50个第二周期细胞供SCE分析, 同时计数50个中期细胞作细胞周期动力学分析。

t 检验分析实验数据 (Block, 1982; Latt, 1981)。

结果和讨论

一、诱变活性 本实验结果表明, 低剂量受试物LABS和Dispersol D, 不能诱发Salmonella HisD3052和HisG46 DNA突变, 但Dispersol D从0.2 mg/板 (无S9时) 和1 mg/板 (有S9时), LABS从1 mg/板 (无S9时) 和3 mg/板 (有S9时) 就开始使回复突变菌落数目显著升高, 并超出阳性对照物若干倍。这表明这两种表面活性物质在高浓度时可致Salmonella突变, 而稀释到一定浓度时, 则无致突变作用。

表1 三种表面活性剂致Salmonella菌株His基因回复突变的影响

实 验 组	浓 度 (mg/板)	回 复 突 变 菌 落 数 目/板			
		TA98		TA100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
脂肪醇聚乙氧醚	3	4	275	8	167
	1	157	4000*	417	4333
	0.2	4500*	25	5000*	70
	0.02	18	33	73	78
	0.002	18	28	75	82
烷基苯磺酸钠	3	388	4500*	600	4500*
	1	5000*	37	5000*	73
	0.2	18	51	68	77
	0.02	20	53	99	79
	0.002	19	37	78	40
烷基醇酰胺	3	0	0	1	1
	1	80	500	14	1150
	0.2	16	31	76	114
	0.02	22	29	71	78
	0.002	18	29	78	88

注: 1. Salmonella组氨酸缺陷型自然回复突变数是: TA100为75(-S9), 83(+S9), TA98为16(-S9), 40(+S9)。

2. 阳性对照物2-AF诱发TA98的回复突变数目是30(-S9)和大于1000(+S9), NaN₃诱发TA100回复突变数目大于1000(-S9, +S9)。

3. *表示有小针点状菌落出现。

表2 四种餐洗剂对小鼠骨髓细胞 SCEs 及核分裂的影响

实验组	剂 量 (mg/鼠)	SCEs范围	SCEs/细胞 \pm S, E.	分 裂 中 期 数			细胞增殖 指数(1)
				M-1	M-2	M-3	
BM	5	0—18	4.38 \pm 0.25*	21.3	76.0	2.7	1.81
	3	0—10	3.60 \pm 0.21*	32.0	61.3	6.7	1.75
	1	0—7	1.97 \pm 0.11*	8.5	73.0	18.5	2.10
TL	5	0—14	3.66 \pm 0.23*	19.3	78.7	2.0	1.83
	3	0—16	3.90 \pm 0.22*	26.7	62.0	11.3	1.85
	1	0—8	2.35 \pm 0.11*	4.7	70.7	24.6	2.20
XJ	5	0—16	4.33 \pm 0.24*	14.7	84.0	1.3	1.87
	3	0—16	3.80 \pm 0.31*	45.0	48.0	7.0	1.62
	1	0—6	2.32 \pm 0.14*	7.0	74.0	19.0	2.12
KA	5	0—21	4.10 \pm 0.29*	24.7	69.3	6.0	1.81
	3	0—17	3.64 \pm 0.25*	25.0	73.0	2.0	1.77
	1	0—6	1.91 \pm 0.08*	6.0	68.5	25.5	2.20
溶剂对照组		0—6	1.61 \pm 0.01	8.0	70.0	22.0	2.14

注: 1. 细胞增殖指数 (cell proliferation index) = $\frac{(\% M-1 \times 1) + (\% M-2 \times 2) + (\% M-3 \times 3)}{100}$

(引自参考文献Husgafvel-Pursiainen, 1987)

2. 标有*为 $P < 0.001$, 标有·为 $P < 0.025$ (与对照组相比)。

关于 LABS 致 Salmonella 突变的效应, 有相互矛盾的报道 (薛京伦, 1984; Gloxhuber, 1980)。这可能与测试剂量不同有关。高浓度时出现抑菌效应, 加入量为 ppm 单位时 (Gloxhuber, 1980), 没有达到阈值浓度, 难以表现出致突变作用 (Aimes, 1975; Kier, 1986) 因此, 我们认为浓度是很重要的因素。

Alkanolamide 能显著地致 HisD3052 突变, 但只有外源代谢激活物参与才诱导 HisG46 回复突变。可能是大鼠肝氧化酶将其转变成了诱导 TA100 突变的中间代谢物。但由于受试物不纯 (工业分析用料), 再加上迄今为止还没有此种化学物质致突变方面的报道, 更进一步深入地研究是必要的。

高浓度 BM、TL、XJ 和 KA 四种餐洗剂都使组氨酸回复突变菌落数目升高, 并且有剂量反应关系, 说明它们是 TA100 和 TA98 的致突变剂。加入 S9 混合液后, TL 牌餐洗剂中有效诱变成份可能转变为其他中间产物, 致 STY 突变作用消失。

同时, 四种餐洗剂在达到一定灌胃剂量时, 也能诱发小鼠骨髓细胞 SCE 频率增加, 高于空白对照组 SCE 频率两倍以上, 并有剂量反应关系, 高频率 SCEs 所占比例高于对照组。根据文献推荐标准 (Latt, 1981), 可以认为这四种餐洗剂高剂量时有诱导小鼠骨髓细胞 SCE 形成的能力。

但低剂量时, 四种餐洗剂均无致 STY 突变作用。另外, 灌胃剂量为 1 mg/鼠体重时 (相当于重量百分比浓度为 0.2%), 餐洗剂所诱发的 SCE 频率与空白对照相比, 没有超过两倍。按 Latt 等人 (1981) 所规定的标准, 可以认定为阴性反应。所以, 在日常生活常用浓度范围 0.1%—0.3% 内, 使用这类表面活性物质是安全的。

表3 四种国产餐洗剂对 *Salmonella* 基因回复突变的诱导研究

实验组	浓 度 (mg/plate)	Number of reversants/plate			
		TA98		TA100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
BM	7		750		1200
	5	18	2000*	77	3000*
	3	121	4500*	466	3248*
	1	2912*	15	4648*	50
	0.8	1500	11	1000	73
	0.4	400	20	58	73
	0.2	20	20	64	82
	0.02	20	28	77	75
TL	7		3		1
	5	21	3	81	4
	3	16	8	68	34
	1	5000*	19	5000*	53
	0.8	3282*	20	4000*	60
	0.4	2000*	20	3504*	65
	0.2	777	25	793	66
	0.02	25	19	60	86
XJ	7		2000*		1500*
	5	15	2500*	69	2000*
	3	19	581	76	14
	1	5000*	15	5000*	40
	0.8	4000*	19	4000*	50
	0.4	700	22	854	65
	0.2	360	21	367	80
	0.02	21	23	62	79
KA	7		1500*		2000*
	5	16	2500*	84	3500*
	3	21	20	67	32
	1	5000*	22	5000*	74
	0.8	3500*	24	3000*	63
	0.4	967	27	235	77
	0.2	245	26	133	89
	0.02	21	31	79	79

注: 1. *Salmonella* 菌株TA100和TA98自发回复突变数目分别是: TA100为89(-S9)92(+S9); TA98为21(-S9), 26(+S9)。

2. TA100的阳性对照物为叠氮化钠, 诱发的回复突变菌落数大于1000(-S9, +S9), TA98的阳性对照物为2-AF, 诱发的回复突变菌落数为35(-S9)和大于1000(+S9)。

3. *表示有针点状小菌落出现。

二、毒性作用 LABS、Dispersol D、Alkanolamide和四种餐洗剂能诱发组氨酸回复突变。同时, 随着浓度逐渐增高, 抑制菌落生长出现, 表现为菌落数目明显减少和根本没有回复突变菌落出现; 或者菌落生长异常, 外观形态呈针点状。这意味着它们对TA100和TA98两种菌株具有毒性效应(Kier, 1984)。这与洗涤剂和其他表面活性剂的毒性作用相类似(Gloxhuber, 1980)。究其原因, 可能是由细菌细胞壁性质所决定的, 或者是表面活性类物质形成微囊胞, 将细菌包入。

加入S9代谢激活体系后, 餐洗剂BM、XJ和KA以及三种主要成分出现阳性反应的

浓度均比未加入S9混合体系提高一个或几个实验浓度梯度, 说明经酶诱导的激活系统含有一些解毒酶系。

另外, 从表2可看出, 随着灌胃剂量增加, 小鼠骨髓细胞增殖指数降低, 即细胞周期时间延长, 这说明四种餐洗剂对小鼠骨髓细胞增殖具有延缓效应。

三、基因水平测试和染色体水平测试结果之间的联系 从理论上讲, SCE形成和点突变之间有相关性。虽然有文献说明SCE与突变相关联(Perry, 1984; Wolff, 1977), 但有人指出有些能诱导SCE形成的化学物质却不能诱发突变(Bradley, 1979; Sirianni, 1987)。本实验结果意味着DNA水平的突变可以反映到染色体水平上, 这说明SCE形成的先决条件是DNA受损(Tsuji, 1987)。

同时, 从表2可看出, SCE形成和细胞增殖指数相关联, 即细胞周期延长, SCE频率增加。但SCE频率增加与细胞增殖速度过低的生物学上的因果关系仍难以确定, 正反两方面的情况都有可能发生(Grossen, 1985; Husgafvel-Pursiainen, 1987)。从四种餐洗剂延缓细胞增殖, 诱发SCE频率增高和M-I期细胞比例高于对照组来看, 可能表明它们不是引发DNA修复反应, 而是使DNA合成和复制困难, 从而导致SCE形成。

致谢 本研究呈施立明研究员指导。

参 考 文 献

- 贺维顺、王辅朝 1988 合成洗涤剂对人和哺乳动物细胞的诱变性的研究。动物学报 9:7-13。
薛京伦、邱信芳 1984 烷基苯磺酸钠和烷基硫酸钠诱变能力的测试以及在中国仓鼠细胞中抑制由丝裂霉素诱发的频率。中国遗传学会环境诱变专业委员会第二次学术会议论文集。
Ames, B. N. et al. 1975 Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
Block, A. W. 1982 Sister chromatid exchange methodology, in: A. A. Sandberg (Eds.), sister chromatid exchange, Alan R. Liss, Inc., New York, pp19-32.
Bradley, G. T. et al. 1979 Relationship between sister chromatid exchanges and mutagenicity, toxicity and DNA damage. *Nature* 282, 318-320.
Gloxhuber, Christian 1980 Anionic surfactants, Marcel Dekker, Inc., pp328-396.
Grossen, P. E. 1985 The effect of temperature and cell cycle length on SCE frequency in rat-J cells. *Mutation Res.*, 149, 101-104.
Husgafvel-Pursiainen, K. 1987 Sister-Chromatid exchange and cell proliferation in cultured lymphocytes of passively and actively smoking restaurant personnel. *Mutation Res.*, 190, 211-215.
Kier, L. E. et al. 1986 A report of the U. S. Environmental Protection Agency gene-tox program. *Mutation Res.*, 168, 211-215.
Latt, S. A. et al. 1981 Sister-chromatid exchanges: a report of the gene-tox program. *Mutation Res.*, 87, 17-62.
Moron, D. M. et al. 1984 Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, in: B. J. Kilbey et al. (Eds.), handbook of mutagenicity test procedures, Elsevier Science Publishers, pp93-140.
Mothur, A. et al. 1986 Toxicological evaluation of a synthetic detergent after repeated oral digestion in rats. *Biol. Mem.*, 12:2, 187-191.
Perry, Paul, E. et al. 1984 The methodology of sister chromatid exchanges, in: B. J. Kilbey et al. (Eds.), handbook of mutagenicity test procedures, Elsevier Science Publishers, pp485-529.
Sirianni, S. R. et al. 1987 Comparison of S9 fractions from rats, mice, and Chinese Hamsters to metabolize dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine to intermediates that induce sister-chromatid exchanges in V79 cells. *Mutation Res.*, 188, 7-11.
Tsuji, H. et al. 1987 Chromosomal instability in mutagen-sensitive mutants isolated from mouse lymphoma L5178Y cells. *Mutation Res.*, 178, 99-106.
Wolff, S. B. et al. 1977 Sister chromatid exchanges induced by mutagenic carcinogens in normal and Xeroderma Pigmentosum cells. *Nature* 265, 347-349.

GENETICAL EFFECT OF SURFACTANTS ON SCE FORMATION OF MOUSE BONE MARROW CELLS AND GENE MUTATION OF *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Hu Jiayang Lin Shiyin Liu Aihua Zhang Hanyun

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica 650107*)

The research employing the techniques of *Salmonella*/microsome reversion assay and SCE analysis evaluates systematically the mutagenic potential of four-brand household liquid detergents and three kinds of ingredients, LABS, Dispersol D and Alkanolamide, based on the effects of these surfactants on the STY test strains with the HisD3052 and HisG46 mutations and on the SCE formation of mouse bone marrow cells. These results indicate that, in the absence of metabolic activators, these four-brand detergents, and LABS and Dispersol D all can significantly reverse the mutation HisD3052 and HisG46 to histidine independence, compared with negative control. Alkanolamide also can elicit the frameshift mutation HisD3052, a positive response, but a negative effect appears in the case of the missense mutation. Otherwise, although, when implemented with exogenous source of metabolic activation, detergent TL dose not exhibit positive response in STY bioassay for mutagenic activity, the other three kinds of detergents and their three main components, Dispersol D, Alkanolamide and LABS can induce a significant reproducible increase in number of the reversant colonies compared with negative control. Nevertheless, it is below certain doses of test materials, or an equivalent exposing to human beings during their house routine that all these test chemicals reproduce a negative response either with or without metabolic activation. The results of SCE analysis demonstrate that four-brand detergents, compared with the solvent control, can induce the SCE formation of mouse bone marrow cells. Their cytotoxicity is observed—that the rates of bone marrow cell proliferation decrease after oral administration of high-dose detergents, and highest doses of all these chemicals tested do give an indication of toxicity as evidenced by the presence of pin-point abnormal colonies on the plates, or the reduction in the spontaneous reversion rate. In addition, the possible relationship between different mutagenic responses is discussed.

Key words: Gene mutation, SCE, Detergent, LABS, Alkanolamide